

無題

1/7/6
DIALOG(R)File 350:Derwent WPIX
(c) 2006 The Thomson Corp. All rts. reserv.

010666309

WPI Acc No: 1996-163263/199617

Antigen-antibody reaction measurement - includes reacting magnetic particles reaction then splitting bonds to labelled particles

Patent Assignee: MITSUBISHI CHEM CORP (MITU)

Number of Countries: 001, Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 8043391	A	19960216	JP 94178358	A	19940729	199617 B

Priority Applications (No Type Date): JP 94178358 A 19940729

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 8043391	A		9	G01N-033/543	

Abstract (Basic): ~~JP 8043391 A~~

Measurement of antigen-antibody reaction uses insol. magnetic particles and insol., labelled particles. In the process, the magnetic particles react with the labelled particles during the antibody-antigen reaction. Then a reagent is added which splits the bond to the labelled particles selectively. The amt. of label released is then measured.

ADVANTAGE - Rapid measurement can be conducted.

Dwg. 0/3

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Main): G01N-033/543

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-43391

(43) 公開日 平成8年(1996)2月16日

(51) Int. Cl.

G01N 33/543

識別記号

501 A

541 A

555 D

F I

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全9頁)

(21) 出願番号 特願平6-178358

(22) 出願日 平成6年(1994)7月29日

(71) 出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 宗林 孝明

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三

菱化成株式会社総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 長谷川 曉司

(54) 【発明の名称】 抗原抗体反応の測定方法

(57) 【要約】

【構成】 不溶性磁性粒子および不溶性標識粒子を用いる抗原抗体反応の測定方法において、不溶性磁性粒子と反応した不溶性標識粒子に抗原抗体反応による特異的結合を解離させる解離液を加えて該不溶性標識粒子を解離させ、解離した該不溶性標識粒子の標識強度を測定する方法。

【効果】 本発明方法によれば、磁性粒子および標識粒子を用いることにより、迅速、簡便にB/F分離が実施でき、かつ、通常のF I Aよりも測定感度を上昇させて抗原、抗体反応を測定することができるだけでなく、抗原抗体反応の特異的結合を解離させて遊離した標識粒子のみを計測するため、磁性粒子の影響を受けることなく、より正確な標識強度の計測が可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 不溶性磁性粒子および不溶性標識粒子を用いる抗原抗体反応の測定方法において、不溶性磁性粒子と反応した不溶性標識粒子に抗原抗体反応による特異的結合を解離させる解離液を加えて該不溶性標識粒子を解離させ、解離した該不溶性標識粒子の標識強度を測定する方法。

【請求項2】 不溶性標識粒子が、蛍光色素標識粒子、酵素標識粒子または化学発光性色素標識粒子であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 解離液が、酸性溶液、アルカリ性溶液、高イオン強度溶液、界面活性剤含有溶液、極性を下げる物質を含有する緩衝液、尿素および塩酸グアニジンを含有する緩衝液またはカオトロピックイオンを含有する緩衝液であることを特徴とする請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は抗原・抗体反応の測定方法に関する。詳しくは、磁性粒子および標識粒子を用いる抗原・抗体反応の測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、抗原抗体反応を利用した免疫測定法が種々の疾病の早期検出法や、極微量の物質の検出法として知られている。高感度な免疫測定法には種々の方法があり、抗体または抗原に対し標識物質としての、放射性同位体 (R I)、酵素、蛍光物質、発光物質などを結合して用いるラジオイムノアッセイ (R I A)、酵素イムノアッセイ (E I A)、蛍光イムノアッセイ (F I A)、発光イムノアッセイ (L I A) などが知られている。また、ラテックス等の不溶性担体粒子に担持された抗体または抗原と、それに対応する抗原または抗体とを反応させ、その反応に伴う反応混合物の透過光の変化から抗原抗体反応の速度を測定する方法 (L P I A) が知られている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、かかる従来技術は種々の問題を持つ。たとえば、R I AはR Iの取扱いおよび廃棄に対する制約がある。L P I Aは簡便性、操作性などに優れた方法であるが、検出感度の改良が望まれている。E I A、F I A、L I Aなどは取扱いの安全性については有利であるが、検出感度はR I Aに若干劣る。また、E I Aは酵素反応を伴うため取扱いもF I Aほど簡便ではない。L I Aも、分離後、発光させるために水酸化ナトリウムなどの試薬を加える必要があるためF I Aに比べると複雑であるという欠点があった。

【0004】 ところで、E I A、F I A、L I Aなどの方法は、通常、反応結合物と未反応物を分離、洗浄する操作 (B/F分離) を必要とするが、これらの方法において、測定操作を煩雑にし、時間のかかるものになっている主な原因はこれらのB/F分離である。B/F分離と

しては、通常、チューブ、マイクロタイターウェルなどの反応管から、未反応物を含む反応液を廃棄した後、洗浄液の供給、インキュベーション、洗浄液の廃棄という洗浄操作を数回繰り返すことが行われている。

【0005】 B/F分離を比較的迅速、簡便に行うためにメンブレン、グラスファイバーなどのフィルターを利用したものがある。これらは、液の流れる方向が一方向であるため (液の廃棄時に吸い出す必要がない)、洗浄工程に必要とする時間も短くて済み、また、自動化など装置化しやすい特徴がある。しかしながら、これらの方法にも、種々の問題点がある。

【0006】 フィルターに一次抗体又は抗原を直接結合させたものでは、フィルターと測定したい項目とが対応している必要があり、フィルターの保管、供給などを考えると自動化装置とする場合に問題がある。また、ラテックス等の微粒子に一次抗体または抗原を結合し、反応後、フィルターに捕集するタイプのものでは、フィルター上に孔径より大きい粒子を捕集するものと、フィルターへの粒子の吸着を利用するものがある。前者では、フィルターが目詰まりすることにより二次抗体などの標識物が完全に洗浄しきれなくて、バックグラウンドの上昇を生じる可能性がある。また、後者では、フィルターへの吸着の原因が解明されていないため、粒子を完全に捕集しているかどうかの判断、また、吸着しやすい素材を用いることによるバックグラウンドの上昇などの問題が残る。また、フィルター内部への吸着を利用するため、E I Aには応用できるが、F I Aの場合、励起光がとどかない可能性もあり応用できない。

【0007】 一方、B/F分離の改良法として、磁性粒子を用いたものも種々報告されている。この方法は、磁力を利用して磁性粒子を集める操作を迅速、簡便にできる特徴がある。しかしながら、標識としてR Iを用いるもの以外の、酵素、蛍光色素、化学発光性色素、あるいはそれらを標識した不溶性担体粒子を使用する系では、いずれも最終的には光学的計測を必要とするため最終測定液中に残存する磁性粒子の光学的計測に与える影響が大きいことが知られている。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは上記問題点を解決すべく鋭意検討した結果、磁性粒子を用いることにより迅速、簡便にB/F分離が実施でき、かつ、標識粒子を用いることにより通常のF I Aよりも測定感度を上昇させた免疫分析方法を見出した。即ち本発明の要旨は、不溶性磁性粒子および不溶性標識粒子を用いる抗原抗体反応の測定方法において、不溶性磁性粒子と反応した不溶性標識粒子に抗原抗体反応による特異的結合を解離させる解離液を加えて該不溶性標識粒子を解離させ、解離した該不溶性標識粒子の標識強度を測定する方法に存する。

【0009】 以下、本発明を詳細に説明する。本発明に

において、不溶性磁性粒子および不溶性標識粒子を用いる抗原抗体反応の測定方法としては、例えば、以下のような方法が挙げられる。

方法 1 : 下記の工程からなる抗原・抗体反応の測定方法。

(a) 測定しようとする抗原又は抗体に対する抗体又は抗原を担持させた不溶性磁性粒子からなる第 1 試薬と、測定しようとする抗原又は抗体とを反応容器の液体媒体中で反応させる。

(b) 工程 (a) の反応後の該不溶性磁性粒子を磁場の作用により反応容器壁に付着させ、該液体媒体を除去する。

(c) 工程 (a) と同一の測定しようとする抗原又は抗体に対する抗体又は抗原を担持させた不溶性標識粒子からなる第 2 試薬と、工程 (b) の反応容器壁に付着した該不溶性磁性粒子とを液体媒体中で反応させる。

(d) 工程 (c) の該不溶性磁性粒子を磁場の作用により反応容器壁に付着させ、該液体媒体及び未反応の不溶性標識粒子を除去し、次いで該不溶性磁性粒子と反応した不溶性標識粒子の標識強度を測定する。

【0010】方法 2 : 下記の工程からなる抗原・抗体反応の測定方法。

(a) 測定しようとする抗体に対する抗原を担持させた不溶性磁性粒子からなる第 1 試薬と、測定しようとする抗体とを反応容器の液体媒体中で反応させる。

(b) 工程 (a) の反応後の該不溶性磁性粒子を磁場の作用により反応容器壁に付着させ、該液体媒体を除去する。

(c) 測定しようとする抗体の免疫グロブリンクラスと特異的に反応する物質を担持させた不溶性標識粒子からなる第 2 試薬と、工程 (b) の反応容器壁に付着した該不溶性磁性粒子とを液体媒体中で反応させる。

(d) 工程 (c) の該不溶性磁性粒子を磁場の作用により反応容器壁に付着させ、該液体媒体及び未反応の不溶性標識粒子を除去し、次いで該不溶性磁性粒子と反応した不溶性標識粒子の標識強度を測定する。

【0011】方法 3 : 下記の工程からなる抗体の測定方法。

(a) 測定しようとする抗体に対する抗体を担持させた不溶性磁性粒子からなる第 1 試薬と、測定しようとする抗体とを反応容器の液体媒体中で反応させる。

(b) 工程 (a) の反応後の該不溶性磁性粒子を磁場の作用により反応容器壁に付着させ、該液体媒体を除去する。

(c) 測定しようとする抗体と特異的に結合する抗原を担持させた不溶性標識粒子からなる第 2 試薬と、工程

(b) の反応容器壁に付着した該不溶性磁性粒子とを液体媒体中で反応させる。

(d) 工程 (c) の該不溶性磁性粒子を磁場の作用により反応容器壁に付着させ、該液体媒体及び未反応の不溶

性標識粒子を除去し、次いで該不溶性磁性粒子と反応した不溶性標識粒子の標識強度を測定する。

【0012】方法 4 : 下記の工程からなる抗原・抗体反応の測定方法。

(a) 測定しようとする抗原又は抗体に対する抗体又は抗原を担持させた不溶性磁性粒子からなる第 1 試薬と、測定しようとする抗原又は抗体とを反応容器の液体媒体中で反応させる。

(b) 工程 (a) の反応後の該不溶性磁性粒子を磁場の作用により反応容器壁に付着させ、該液体媒体を除去する。

(c) 測定しようとする抗原又は抗体と同じ特異性を有する抗原又は抗体を担持させた不溶性標識粒子からなる第 2 試薬と、工程 (b) の反応容器壁に付着した該不溶性磁性粒子とを液体媒体中で反応させる。

(d) 工程 (c) の該不溶性磁性粒子を磁場の作用により反応容器壁に付着させ、該液体媒体及び未反応の不溶性標識粒子を除去し、次いで該不溶性磁性粒子と反応した不溶性標識粒子の標識強度を測定する。

【0013】方法 5 : 下記の工程からなる抗原・抗体反応の測定方法。

(a) 測定しようとする抗原又は抗体と同一の抗原又は抗体を担持させた不溶性磁性粒子からなる第 1 試薬と、該測定しようとする抗原又は抗体に対する抗体又は抗原の一定量とを、該測定しようとする抗原又は抗体の存在下反応容器の液体媒体中で反応させる。

(b) 工程 (a) の反応後の該不溶性磁性粒子を磁場の作用により反応容器壁に付着させ、該液体媒体を除去する。

(c) 工程 (a) で不溶性磁性粒子に担持した該抗原又は抗体と反応した該抗体又は抗原と反応しうる物質を担持させた不溶性標識粒子からなる第 2 試薬と、工程

(b) の反応容器壁に付着した該不溶性磁性粒子とを液体媒体中で反応させる。

(d) 工程 (c) の該不溶性磁性粒子を磁場の作用により反応容器壁に付着させ、該液体媒体及び未反応の不溶性標識粒子を除去し、次いで該不溶性磁性粒子と反応した不溶性標識粒子の標識強度を測定する。

【0014】方法 6 : 下記の工程からなる抗原・抗体反応の測定方法。

(a) 測定しようとする抗原に対する抗体を担持させた不溶性磁性粒子からなる第 1 試薬と、ビオチンで標識した該測定しようとする抗原と同一の抗原の一定量とを、該測定しようとする抗原の存在下反応容器の液体媒体中で反応させる。

(b) 工程 (a) の反応後の該不溶性磁性粒子を磁場の作用により反応容器壁に付着させ、該液体媒体を除去する。

(c) アビジンまたは抗ビオチン抗体を担持させた不溶性標識粒子からなる第 2 試薬と、工程 (b) の反応容器

壁に付着した該不溶性磁性粒子とを液体媒体中で反応させる。

(d) 工程 (c) の該不溶性磁性粒子を磁場の作用により反応容器壁に付着させ、該液体媒体及び未反応の不溶性標識粒子を除去し、次いで該不溶性磁性粒子と反応した不溶性標識粒子の標識強度を測定する。

【0015】方法 7: 下記の工程からなる抗原・抗体反応の測定方法。

(a) 測定しようとする抗体と同一の抗体を担持させた不溶性磁性粒子からなる第 1 試薬と、ビオチンで標識した該測定しようとする抗体に対する抗原の一定量とを、該測定しようとする抗体の存在下反応容器の液体媒体中で反応させる。

(b) 工程 (a) の反応後の該不溶性磁性粒子を磁場の作用により反応容器壁に付着させ、該液体媒体を除去する。

(c) アビジン又は抗ビオチン抗体を担持させた不溶性標識粒子からなる第 2 試薬と、工程 (b) の反応容器壁に付着した該不溶性磁性粒子とを液体媒体中で反応させる。

(d) 工程 (c) の該不溶性磁性粒子を磁場の作用により反応容器壁に付着させ、該液体媒体及び未反応の不溶性標識粒子を除去し、次いで該不溶性磁性粒子と反応した不溶性標識粒子の標識強度を測定する。

【0016】本発明で使用する不溶性磁性粒子は、たとえば、四三酸化鉄 (Fe_3O_4)、三二酸化鉄 ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)、各種フェライト、鉄、マンガン、ニッケル、コバルト、クロムなどの金属、コバルト、ニッケル、マンガンなどの合金からなる微粒子またはこれらの磁性粒子を内部に含んだポリスチレン、ポリアクリロニトリル、ポリメタクリロニトリル、ポリメタクリル酸メチル、ポリカプラミド、ポリエチレンテレフタレートなどの疎水性重合体、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリ (2-オキシエチルアクリレート)、ポリ (2-オキシエチルメタクリレート)、ポリ (2, 3-ジオキシプロピルアクリレート)、ポリ (2, 3-ジオキシプロピルメタクリレート)、ポリエチレングリコールメタクリレートなどの架橋した親水性重合体、またはそれぞれのモノマーの 2-4 種程度の共重合体などのラテックス、ゼラチン、リボソームまたは、上記磁性微粒子をラテックス、ゼラチン、リボソームなどの表面に固定化した粒子などが用いられる。

【0017】不溶性磁性粒子の粒径は $0.05\mu\text{m}\sim 5\mu\text{m}$ のものが用いられ、 $0.1\mu\text{m}\sim 1\mu\text{m}$ の範囲内の粒径を有する不溶性磁性粒子が好ましい。本発明で 사용되는不溶性標識粒子に担持させる標識としては、既に種々のものが知られており、本発明でも特に制限はされない。好ましくは、蛍光色素、酵素、化学発光性色素が挙げられる。酵素標識では、たとえばペルオキシダー

ゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ等が良く利用される。また、蛍光色素としては、たとえば、ユーロピウム (Eu)、テルビウム (Tb)、サマリウム (Sm) などの希土類キレートや、フィコシアニン、フィコエリスリンなどのフィコビリプロテイン、フルオレッセイン、テトラメチルローダミン、テキサスレッド、4-メチルウンベリフェロン、7-アミノ-4-メチルクマリンなどが知られている。また、化学発光性色素では、例えば、アクリジニウムエステル、ルミノール、イソルミノール、あるいはこれらの誘導体などがある。

【0018】これらの標識を施す不溶性担体粒子としては、反応させる時に用いる液体媒体に実質的に不溶性で、 $0.05\sim 5\mu\text{m}$ 、好ましくは $0.1\sim 1\mu\text{m}$ の平均粒径を有するものが用いられる。担体粒子の材質は上記不溶性磁性粒子で述べたものと同様に、ポリスチレン、ポリアクリロニトリル、ポリメタクリロニトリル、ポリメタクリル酸メチル、ポリカプラミド、ポリエチレンテレフタレートなどの疎水性重合体、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリ (2-オキシエチルアクリレート)、ポリ (2-オキシエチルメタクリレート)、ポリ (2, 3-ジオキシプロピルアクリレート)、ポリ (2, 3-ジオキシプロピルメタクリレート)、ポリエチレングリコールメタクリレートなどの架橋した親水性重合体、またはそれぞれのモノマーの 2-4 種程度の共重合体などのラテックス、ゼラチン、リボソームに加えて、赤血球のような生体成分、金コロイドのような金属コロイド粒子等が用いられる。

【0019】不溶性担体粒子に標識を担持させる方法としては、粒子表面の官能基を利用して化学的に結合させる方法、粒子を重合して合成する際に、標識を加えて粒子内部に封じ込める方法、粒子内部または表面に物理的に吸着、封入させる方法、あらかじめ、タンパク質、ペプチドなどと物理的または化学的に標識を結合させておいてからそのタンパク質、ペプチドを粒子に固定化する方法などがある。たとえば、特開昭 54-101439 号公報には希土類キレートを TOPO (トリ-n-オクチルホスフィンオキシド) との協同抽出法を利用して有機高分子のラテックスの内部に閉じ込める方法が述べられている。これに従って作製した標識粒子は標識強度、安定性共に良好である。

【0020】本発明において、不溶性磁性粒子及び不溶性標識粒子に担持させる抗体としては通常 1gG が用いられるが、ペプシン、パパインなどの消化酵素あるいはジチオスレイトール、メルカプトエタノールなどの還元剤を用いて、 F(ab')_2 、 Fab' 、 Fab などの低分子化したものを用いても良い。また、 1gG だけでなく 1gM あるいはこれを 1gG と同様の処理で低分子化したフラグメントを用いても良い。また、モノクロー

ナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれも適用できる。モノクローナル抗体を用いる時は、B型肝炎ウイルス表面抗原のように繰り返し構造をもつタンパク質や、CA 19-9抗原のように分子内にエпитープを複数持つ抗原に対してはモノクローナル抗体は1種類以上で使用する。また、認識エпитープの異なるものを2種類以上組み合わせても使用できる。

【0021】一方、担持させる抗原としては、たとえばタンパク質、ポリペプチド、ステロイド、多糖類、脂質、花粉、遺伝子工学的に産生された組換えタンパク質、薬物など種々のものが挙げられる。即ち、本発明で言う「抗原」とは、人、あるいは動物に対し抗体産生を惹起する能力のあるすべての物質のうち、例えば診断等特別の目的の下に選択された単一あるいは複数の物質、ないしはそれらを含有する混合物が挙げられる。

【0022】本発明においては、測定しようとする物質が抗体の場合、不溶性磁性粒子に測定しようとする抗体に対する抗原を担持させ、不溶性標識粒子に測定しようとする抗体の免疫グロブリンクラスと特異的に反応する物質を担持させることもできる（上記方法2）。不溶性磁性粒子を担持させる抗原としては上記と同様のものが挙げられる。不溶性標識粒子に担持させる抗体の免疫グロブリンクラスと特異的に反応する物質としては、Ig G、Ig A、Ig M、Ig D、Ig Eもしくはそれらの抗体軽鎖部分に対する抗体、プロテインAまたは補体成分の一種であるC1q等のように、ある種の抗体分子の特徴を選択的に認識して結合する能力を有する物質を言う。

【0023】さらに、本発明においては、測定しようとする物質が抗体の場合、不溶性磁性粒子に測定しようとする抗体に対する抗体を担持させ、不溶性標識粒子に測定しようとする抗体と特異的に結合する抗原を担持させることもできる（上記方法3）。不溶性磁性粒子に担持させる測定しようとする抗体に対する抗体（以下、後者の抗体を便宜上「抗体」と略することがある）とは、測定しようとする抗体に対するいわゆる免疫グロブリンと称するタンパク、および測定しようとする抗体の免疫グロブリンクラスと特異的に反応する物質を意味する。

【0024】前者を担持させる場合、通常Ig Gクラスの免疫グロブリンが用いられるが、ペプシン、パパインなどの消化酵素、あるいはジチオスレイトール、メルカプトエタノールなどの還元剤を用いて、F(ab')₂化、Fab'化、Fab化する等の低分子化したものを用いても良い。また、Ig Gだけでなく、Ig M、あるいはこれをIg Gと同様の処理で低分子化したフラグメントを用いても良い。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれも適用可能である。

【0025】後者を担持させる場合は上記と同様のものが挙げられる。不溶性標識粒子に担持させる測定しようとする抗体と特異的に結合する抗原とは、上記で挙げた

通りである。本発明において、不溶性標識粒子に、測定しようとする抗原または抗体と同じ特異性を有する抗原または抗体が担持される場合（上記方法4）、これらは、前述のとおり物理的または化学的に固定化される。本発明における「特異性を有する」とは、測定しようとする物質が抗原である場合、前述した抗原と生物学的あるいは生理学的に同一なものとして生体に非自己として認識され、抗体の産生を導く物質全般を指す。測定しようとする物質が抗体である場合は、かかる抗体の免疫グロブリンクラスと反応するもの、すなわちIg G、Ig A、Ig M、Ig D、Ig Eもしくはそれらの抗体軽鎖部分に対する抗体、プロテインAまたは補体成分の一種であるC1q等のように、ある種の抗体分子の特徴を選択的に認識して結合する能力を有する物質を言う。

【0026】また、本発明の上記方法5において標識粒子に固定化する不溶性磁性粒子に担持した抗原又は抗体と反応した抗体又は抗原と反応し得る物質としては、上記不溶性磁性粒子で挙げたような抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体いずれも可）または抗原に加え、上記のような抗体の免疫グロブリンクラスと特異的に反応する物質、アビジン又はストレプトアビジン等の抗ビオチン抗体が挙げられる。

【0027】不溶性磁性粒子および不溶性標識粒子に上記のような抗原、抗体等を担持させる方法としては、これらの物質を物理的に吸着させるか、あるいは化学的に担持させることにより行われる。物理的に吸着させる方法としては、不溶性磁性粒子および不溶性標識粒子に、抗原、抗体等を直接固定化する方法、アルブミンなどの他のタンパク質に化学的に結合させてから吸着させて固定化する方法が挙げられる。

【0028】化学的に担持させる方法としては、不溶性磁性粒子および不溶性標識粒子の表面に存在するアミノ基、カルボキシル基、メルカプト基、ヒドロキシル基、アルデヒド基、エポキシ基などを化学的に修飾することにより抗原分子、抗体分子等と結合させることができる官能基を利用して、直接粒子上に固定化する方法、粒子と抗原分子、抗体分子等の間にスペーサー分子を化学結合で導入して固定化する方法、アルブミンなどの他のタンパク質に抗原、抗体等を化学結合させた後、そのタンパク質を粒子に化学結合させる方法が挙げられる。

【0029】その他、固定化したい抗原、抗体等と特異的に結合する物質（たとえば抗体、プロテインA、など）を粒子表面に物理的または化学的に結合させた後、目的の抗原、抗体等を結合させることにより粒子表面に固定化する方法も挙げられる。一般的に担持される抗原、抗体等の量は、用いる不溶性担体粒子の表面積、官能基量等により異なるが、通常担体粒子1gあたり1mg～500mg、好ましくは10mg～100mgである。

【0030】不溶性標識粒子において標識と上記抗体、

10

20

30

40

50

抗原等を担持する順序には特に制限はないが、標識を担持した後、抗体、抗原等を担持するのが好ましい。次に本発明の代表的反応系を例にして、本発明についてさらに詳細に説明する。試料溶液中の抗原を測定することを目的とし、不溶性磁性粒子に該抗原に対する抗体、また、標識として蛍光色素を用い、該不溶性蛍光色素標識粒子に該抗原に対する抗体を担持させた粒子を用いた系として説明する。

【0031】まず測定しようとする抗原を含むと考えられる試料溶液と、該抗原に対する抗体を担持させた不溶性磁性粒子（第1試薬）とを反応容器の液体媒体中で混合し反応させる（第一反応）。反応開始時の混合は十分に行う必要があるが、均一に混合された後は混合を止め放置して反応させてもよい。反応は一般の免疫化学反応と同様にpH5~10、好ましくはpH7~9にて行う。温度については、2~50℃の範囲で実施可能であるが、望ましくは室温乃至は37~40℃で反応させる。反応時間は、反応直後から1昼夜まで任意であるが、感度、操作性を考慮して、通常3~60分の範囲で設定される。これらの反応条件は、以降の工程についても同様である。

【0032】目的のpHを維持するために、通常緩衝液が用いられる。緩衝液としては、例えばリン酸、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン等が用いられるが、中性から弱アルカリ性で常用される殆どの緩衝液が使用可能である。多くの場合、非特異反応を避けるために、塩化ナトリウム等の塩類及び牛血清アルブミン等のタンパク質が添加される。

【0033】この時、不溶性磁性粒子は反応液に対して0.0001~1重量%、好ましくは0.001~0.1重量%となるように使用される。不溶性磁性粒子と試料とを混合すると、試料中に含まれる抗原が粒子表面上の抗体と結合する。次いで、磁場の作用により、不溶性磁性粒子を反応液から分離し、反応容器壁に付着させる。残存する反応液を除いた後、必要に応じて洗浄工程（適当な洗浄液を加え、攪拌し、直ちに磁場を付与して分離後、溶液を除く）を数回繰り返す。その後、分離した不溶性磁性粒子と第一反応と同一の測定しようとする抗原に対する抗体を担持させた不溶性蛍光色素標識粒子（第2試薬）とを混合し第一反応と同様にして液体媒体中で反応させる（第二反応）。不溶性蛍光色素標識粒子も、上記の不溶性磁性粒子と同様に緩衝液に懸濁させて使用される。このとき不溶性蛍光色素標識粒子は反応液中に0.00001~0.1重量%、好ましくは0.0001~0.01重量%で用いられる。

【0034】不溶性磁性粒子と不溶性蛍光色素標識粒子とを混合すると上記第一反応で不溶性磁性粒子と結合した抗原が、蛍光粒子表面上の抗体と結合する。次いで磁場の作用により不溶性磁性粒子を反応液から分離し反応容器壁に付着させる。残存する反応液を除いた後、必要

に応じて洗浄工程を数回繰り返す。その後、分離した不溶性磁性粒子に最終分散液を加え、懸濁液として、該溶液に含まれる不溶性蛍光色素標識粒子の量を、蛍光色素に固有の励起光を照射し、放出される蛍光強度を計測することにより測定する。例えば、Euキレートを標識色素とした場合、励起光は300~380nmまたは240~270nmの紫外光であり、蛍光は600~630nm（615nmに極大値を有する）である。

【0035】この時、最終的に残った標識粒子の蛍光強度の測定を磁性粒子を分散させた懸濁液の状態で行うと、分散している磁性粒子による光学的な妨害により正確な計測は困難である。すなわち、磁性粒子濃度が高すぎると計測を極めて困難なものにするため、使用する磁性粒子濃度に制限が生じてしまう。この点を改善するため、本発明は、上記最終分散液のかわりに抗原・抗体反応による特異的な結合を解離させることのできる解離液を加え、混合後、磁場の作用により不溶性磁性粒子を液体媒体から分離し、計測に影響しない反応容器壁に付着させ、特異的結合を解離して遊離した標識粒子のみを計測することによって、より正確な標識粒子強度の計測を可能とした。

【0036】粒子状のものが存在するいわゆる懸濁液では、光学的計測は不利であることは広く知られている。また、免疫測定法において標識した不溶性担体粒子を用いた場合、免疫反応、分離、次いで、洗浄後、最終的に残存している粒子は一般的に不溶性磁性粒子の方がかなり高い比率で存在するため、解離して遊離した不溶性標識粒子の影響は磁性粒子に比べて小さく、光散乱などを起こして計測に影響するレベルではない。従って磁性粒子のみでも計測系から除去する効果は極めて大きい。

【0037】抗原・抗体反応による特異的な結合を解離される条件としては、アフィニティークロマトグラフィー等で種々のものが知られている（例えば、"Affinity Chromatography principles & methods" Pharmacia LKB Biotechnology 参照）が、本発明の解離液としても、これらで知られている条件が利用できる。即ち、本発明で使用される解離液としては、塩酸、硫酸、プロピオン酸、酢酸、グリシン/塩酸バッファー等の酸性溶液、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア、ジエチルアミン等のアルカリ性溶液、3N塩化ナトリウム、4.5M塩化マグネシウム等の高イオン強度溶液、SDS、Triton X-100、Tween 20等の界面活性剤含有溶液、ジオキサン、エチレングリコール等の極性を下げる物質を含有する緩衝液、トリクロロ酢酸、チオシアン酸などのカオトロピックイオンや尿素、塩酸グアニジン等を含有する緩衝液が挙げられる。

【0038】なお解離液を加える量は1反応容器あたり50μl~1mlである。抗原または抗体を定量する場

合は、予め抗原又は抗体濃度既知品を、或は抗原又は抗体基準品を試料として測定を行い、得られた定量値を試料の抗原又は抗体濃度に対して図示すれば該抗原又は抗体の検量線が得られるので、濃度未知試料の反応定量値から該抗原又は抗体の濃度が求められる。

【0039】磁場のかけ方に関しては、第一反応後の不溶性磁性粒子を約1〜3分程度で、また、同様に第二反応後の不溶性蛍光色素標識粒子と結合した不溶性磁性粒子も約1〜3分程度で分離できるような磁場の強度及び反応系の形状が好ましい。分離に要する時間が短すぎると、一般に感度、再現性の低下を招き、長すぎると操作性を悪化させる。こうした理由から反応系の大きさは比較的小さい方が扱い易い。96穴マイクロプレートなどは個々のウェルのサイズは小さく、ウェル間の隙間に小磁石を置けば、マイクロプレートを利用したEIAと同様にマイクロプレートリーダーを用いて容易に抗原又は抗体を定量できるので本発明の実施に適した反応容器のための材料である。また、ポリスチレン、アクリルなどのプラスチックや、ガラスで作成したチューブ、キュベットなども本発明に適した反応容器のための材料である。磁石としては、永久磁石、電磁石等を使用する。

【0040】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下に限定されるものではない。なお、以下の実施例において使用した洗浄液の組成はすべて同一で、50mMトリス、0.9% NaCl、0.1% Tween 20、pH9.0からなり、解離液は0.1N NaOH、0.1% SDSからなる。

実施例1

平均粒径0.7 μ mの磁性体含有ポリスチレンラテックス（以下、Mgラテックスとする。ローヌプーラン社）に、抗TSHモノクローナル抗体をカルボジイミドを用いて、化学結合法により固定化した後、牛血清アルブミン（BSA）で処理することにより粒子を安定化させ、緩衝液に、0.05%、0.4%の濃度で懸濁させ、Mgラテックス試薬を作成した。

【0041】希土類キレート化合物（イーストマンコダック社） 1×10^{-4} モルとTOPO（トリオクチルホスフィンオキシド）（同仁化学） 2×10^{-4} モルをアセトン40gに溶解した後、平均粒径0.653 μ mのポリスチレンラテックス（Seradyn社）3gを水40mlに懸濁させたものを混合し、エバポレーターによりアセトンを除去することにより、ラテックス粒子にEuキレート化合物をTOPOと協同抽出し、Euキレート標識ラテックス（以下、Euラテックスとする。）を作製した。

【0042】EuラテックスにもMgラテックスと同様に化学結合法で、Mgラテックスに固定化したものとは別のエピトープを認識する抗TSHモノクローナル抗体

を固定化し、BSAで処理することにより粒子を安定化させ、緩衝液に、0.003%の濃度で懸濁させ、Euラテックス試薬を作成した。ヒトTSH標準液（Zymed社）を正常ウサギ血清含有緩衝液で希釈して、0、0.1、0.3、1、3IU/Lの標準液を作成した。

【0043】標準液40 μ L、BSA含有トリス緩衝液250 μ L、上記2種の濃度のMgラテックス試薬40 μ Lを加えた後攪拌し、5分間免疫反応を行わせた。次に、磁石を用いて反応セル中のMgラテックスを反応液から分離し、上清を除いた後、緩衝液250 μ L、上記Euラテックス試薬40 μ Lを加えて攪拌し、10分間免疫反応を行わせた。

【0044】磁石を用いて反応セル中のMgラテックスを反応液から分離し、残りの反応液を除去し、洗浄液を300 μ L加え、攪拌し、直ちに磁石で分離する。上清を除去し、洗浄液を加えて攪拌する。この分離、洗浄工程を3回繰り返した後、Mgラテックスを磁石で分離し、上清を除去し、最終分散液として洗浄液300 μ Lを加え攪拌した後、懸濁液の蛍光強度を測定する場合（分散系）と、最終分散液に解離液を300 μ L加えて攪拌した後、磁石を用いて反応セル壁にMgラテックスを分離した後、遊離したEuラテックスの蛍光強度を測定する場合（解離系）の2とおりについて比較した。

【0045】最終サンプル中のEuラテックスの量は、340nmの励起光に対する615nmの蛍光を計測することにより測定した。Xeフラッシュランプと光電子増倍管（浜松ホトニクス社）により自作した時間分解蛍光測定装置を用いて測定した結果を図1に示した。図中、分散系でMgラテックス濃度が0.05%を□で、解離系でMgラテックス濃度が0.05%を◆で、分散系でMgラテックス濃度が0.4%を■で、解離系でMgラテックス濃度が0.4%を◇で表す。

【0046】Mgラテックス濃度が0.05%の場合は、分散系でも解離系でも大差ない結果が得られたが、Mgラテックス濃度が0.4%の場合、分散系では、残存したMgラテックスの光散乱等の影響を受けて蛍光強度は非常に小さい値になっているが、解離液を用いた系ではMgラテックスの影響を受けないので良好な蛍光強度が計測された。

実施例2

平均粒径0.7 μ mの磁性体含有ポリスチレンラテックス（以下、Mgラテックスとする。ローヌプーラン社）に、遺伝子組換え法により産生したB型肝炎ウイルスコア抗原（HBcAg）（化学及血清療法研究所）をカルボジイミドを用いて、化学結合方により固定化した後、BSAで処理することにより粒子を安定化させ、緩衝液に、0.05%の濃度で懸濁させ、Mgラテックス試薬を作成した。

【0047】実施例1で作成したEuラテックスに抗HBcAgモノクローナル抗体をカルボジイミドを用い

て、化学結合法により固定化した後、BSAで処理することにより粒子を安定化させ、緩衝液に、0.003%の濃度で懸濁させ、Euラテックス試薬を作成した。RIA法で抗HBcAg抗体を測定済の、陽性検体2検体、陰性検体1検体を用いて特異性を調べた。

【0048】検体10 μ L、BSA含有トリス緩衝液250 μ L、上記Mgラテックス試薬40 μ Lを加えた後攪拌し、5分間免疫反応を行わせた。次に、磁石を用いて反応セル中のMgラテックスを反応液から分離し、上清を除いた後、緩衝液250 μ L、上記Euラテックス試薬40 μ Lを加えて攪拌し、10分間免疫反応を行わせた。

【0049】磁石を用いて反応セル中のMgラテックスを反応液から分離し、残りの反応液を除去し、洗浄液を300 μ L加え、攪拌し、直ちに磁石で分離する。この分離、洗浄工程を2回繰り返した後、Mgラテックスを磁石で分離し、上清を除去し、最終分散液として0.1%SDS含有0.1規定NaOH300 μ Lを加え、攪拌して免疫反応によりMgラテックスと結合しているEuラテックスを解離させた後、磁石でMgラテックスを分離した上清中のEuラテックスの蛍光強度を測定した。

【0050】上清サンプルに含まれるEuラテックスの量は、340nmの励起光に対する615nmの蛍光を計測することにより測定した。Xeフラッシュランプと光電子増倍管（浜松ホトニクス社）により自作した時間分解蛍光測定装置を用いて測定した結果を表1に示した。阻害法であるため、陰性検体では高い蛍光強度、陽性検体では低い蛍光強度が観測された。

【0051】

【表1】

表1	
サンプル	蛍光強度
陰性検体	65570
陽性検体 (Low)	44439
陽性検体 (High)	21900

【0052】実施例3

平均粒径0.7 μ mの磁性体含有ポリスチレンラテックス（以下、Mgラテックスとする。ローヌプーラン社）に、抗T3モノクローナル抗体（Scantibodies Laboratory）をカルボジイミドを用いて、化学結合法により固定化した後、BSAで処理することにより粒子を安定化させ、緩衝液に、0.05%の濃度で懸濁させ、Mgラテックス試薬を作成した。

【0053】実施例1で作成したEuラテックスにT3（Sigma）をカルボジイミドを用いて、化学結合法により固定化した後、BSAで処理することにより粒子を安定化させ、緩衝液に、0.003%の濃度で懸濁さ

せ、Euラテックス試薬を作成した。T3を緩衝液に溶解した0.156、6.25、25、125ng/mlの標準液を用いて、反応性を調べた。

【0054】検体40 μ L、BSA含有トリス緩衝液250 μ L、上記Mgラテックス試薬40 μ Lを加えた後攪拌し、5分間免疫反応を行わせた。次に、磁石を用いて反応セル中のMgラテックスを反応液から分離し、上清を除いた後、緩衝液250 μ L、上記Euラテックス試薬40 μ Lを加えて攪拌し、10分間免疫反応を行わせた。

【0055】磁石を用いて反応セル中のMgラテックスを反応液から分離し、残りの反応液を除去し、洗浄液を300 μ L加え、攪拌し、直ちに磁石で分離する。この分離、洗浄工程を2回繰り返した後、Mgラテックスを磁石で分離し、上清を除去し、最終分散液として0.1%SDS含有0.1規定NaOH300 μ Lを加え、攪拌して免疫反応によりMgラテックスと結合しているEuラテックスを解離させた後、磁石でMgラテックスを分離した上清中のEuラテックスの蛍光強度を測定した。

【0056】上清サンプルに含まれるEuラテックスの量は、340nmの励起光に対する615nmの蛍光を計測することにより測定した。Xeフラッシュランプと光電子増倍管（浜松ホトニクス社）により自作した時間分解蛍光測定装置を用いて測定した結果を図2に示した。阻害法であるため、検体中のT3濃度が高くなればなるほど、低い蛍光強度が観測された。

【0057】実施例4

平均粒径0.7 μ mの磁性体含有ポリスチレンラテックス（以下、Mgラテックスとする。ローヌプーラン社）に、抗T4モノクローナル抗体（Scantibodies Laboratory）をカルボジイミドを用いて、化学結合法により固定化した後、BSAで処理することにより粒子を安定化させ、緩衝液に、0.05%の濃度で懸濁させ、Mgラテックス試薬を作成した。

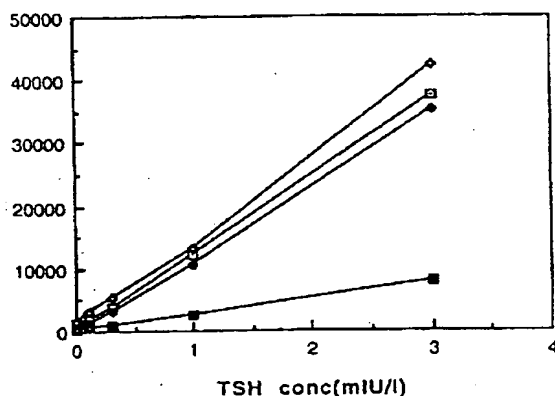
【0058】実施例1で作成したEuラテックスに抗ビオチン抗体（Sigma）をカルボジイミドを用いて、化学結合法により固定化した後、BSAで処理することにより粒子を安定化させ、緩衝液に、0.003%の濃度で懸濁させ、Euラテックス試薬を作成した。T4をビオチン化試薬NHS-LC-Biotin II（Pierce社）を用いてビオチン標識し、トリス緩衝液で 5×10^{-10} mol/lに希釈して、標識抗原溶液とした。

【0059】T4を緩衝液に溶解した0.10、30、100、300、1000ng/mlの標準液を用いて、反応性を調べた。検体20 μ L、BSA含有トリス緩衝液200 μ L、上記標識抗原溶液40 μ L、上記Mgラテックス試薬40 μ Lを加えた後攪拌し、5分間免疫反応を行わせた。

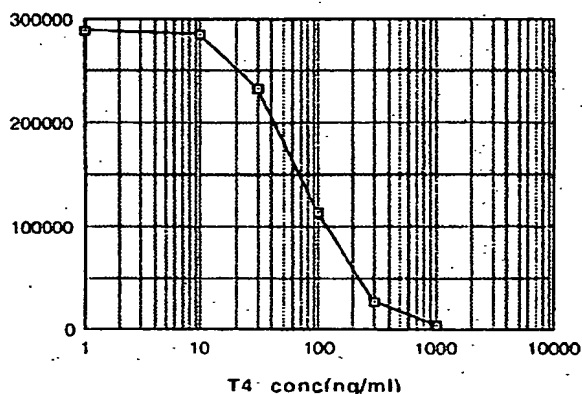
【0060】次に、磁石を用いて反応セル中のMgラテックスを反応液から分離し、上清を除いた後、緩衝液250 μ L、上記Euラテックス試薬40 μ Lを加えて攪拌し、10分間免疫反応を行わせた。磁石を用いて反応セル中のMgラテックスを反応液から分離し、残りの反応液を除去し、洗浄液を300 μ L加え、攪拌し、直ちに磁石で分離する。この分離、洗浄工程を2回繰り返した後、Mgラテックスを磁石で分離し、上清を除去し、最終分散液として0.1% SDS含有0.1規定NaOH 300 μ Lを加え、攪拌して免疫反応によりMgラテックスと結合しているEuラテックスを解離させた後、磁石でMgラテックスを分離した上清中のEuラテックスの蛍光強度を測定した。

【0061】上清サンプルに含まれるEuラテックスの量は、340nmの励起光に対する615nmの蛍光を計測することにより測定した。Xeフラッシュランプと光電子増倍管（浜松ホトニクス社）により自作した時間分解蛍光測定装置を用いて測定した結果を図3に示し

【図1】



【図3】



た。阻害法であるため、検体中のT4濃度が高くなればなるほど、低い蛍光強度が観察された。

【0062】

【発明の効果】本発明方法によれば、磁性粒子および標識粒子を用いることにより、迅速、簡便にB/F分離が実施でき、かつ、通常のFIAよりも測定感度を上昇させて抗原、抗体反応を測定することができるだけでなく、抗原抗体反応の特異的結合を解離させて遊離した標識粒子のみを計測するため、磁性粒子の影響を受けることなく、より正確な標識強度の計測が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で解離液での解離を行った場合と行わなかった場合の反応液の蛍光強度とTSH濃度との関係を表す図である。

【図2】実施例3の検体中のT3濃度と蛍光強度との関係を表す図である。

【図3】実施例4の検体中のT4濃度と蛍光強度との関係を表す図である。

【図2】

